



ARTÍCULO CIENTÍFICO

Evaluación de la genotoxicidad inducida por la administración repetida de anestésicos locales: un estudio experimental en ratones

Gisele Alborghetti Nai^{a,*}, Mariliza Casanova de Oliveira^b, Graziela de Oliveira Tavares^c, Laís Fabrício Fonseca Pereira^c, Nádia Derli Salvador Lemes Soares^d y Patrícia Gatti Silva^d

^a Departamento de Patología, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, Brasil

^b Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, Brasil

^c Facultad de Odontología de Presidente Prudente, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, Brasil

^d Facultad de Medicina de Presidente Prudente, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, Brasil

Recibido el 16 de mayo de 2013; aceptado el 25 de julio de 2013

Disponible en Internet el 31 de octubre de 2014

PALABRAS CLAVE

Anestesia;
Genotoxicidad;
Tests de
mutagenicidad;
Tests de
micronúcleos;
Prilocaína

Resumen

Justificación y objetivos: Estudios previos sobre los efectos de algunos anestésicos locales han mostrado que esos agentes pueden causar alteraciones genéticas. Sin embargo, esos agentes no son testados para la genotoxicidad relacionada con la administración repetida. El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial genotóxico de anestésicos locales después de repetidas administraciones.

Métodos: 80 ratones Wistar machos se dividieron en: grupo A: 16 ratones que recibieron inyección por vía intraperitoneal (IP) de clorhidrato de lidocaína al 2%; grupo B: 16 ratones a los que se les administró inyección IP con mepivacaína al 2%; grupo C: 16 ratones que recibieron inyección IP de articaína al 4%; grupo D: 16 ratones a los que se les administró inyección IP de prilocaína al 3% (6 mg/kg); grupo E: 8 ratones que recibieron inyección subcutánea en dosis única de ciclofosfamida; grupo F: 8 ratones que recibieron inyección IP con solución salina. Ocho ratones de los grupos A a D recibieron una dosis única de anestésico el primer día de la experiencia; los ratones restantes se dosificaron una vez por día durante 5 días.

Resultados: La mediana del número de micronúcleos en los grupos con anestésicos locales expuestos durante uno o 5 días varió de 0 a 1; en el grupo expuesto a la ciclofosfamida fue de 10 y en el grupo control negativo en el primero y quinto día fue de 1 y 0 respectivamente ($p < 0,0001$). Se observó una diferencia significativa en el número de micronúcleos entre el grupo ciclofosfamida y todos los grupos con anestésicos locales ($p = 0,0001$), pero no entre el grupo control negativo y los grupos con anestésicos locales ($p > 0,05$).

* Autora para correspondencia.

Correos electrónicos: patologia@unoeste.br, gica@muramet.com.br (G.A. Nai).

KEYWORDS

Anesthesia;
Genotoxicity;
Mutagenicity tests;
Micronucleus tests;
Prilocaine

Conclusión: Ningún efecto de genotoxicidad fue observado después de la exposición repetida a cualquiera de los anestésicos locales evaluados.

© 2013 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda.

Este es un artículo Open Access bajo la licencia [CC BY-NC-ND](#)

Evaluation of genotoxicity induced by repetitive administration of local anesthetics: an experimental study in rats

Abstract

Background and objective: Previous studies regarding the effects of some local anesthetics have suggested these agents may cause genetic damage. However, they have not been tested for genotoxicity related to repetitive administration. The aim of this study was to evaluate the genotoxic potential of local anesthetics upon repetitive administration.

Methods: 80 male Wistar rats were allocated into: group A - 16 rats injected intraperitoneally (IP) with lidocaine hydrochloride 2%; group B - 16 rats IP injected with mepivacaine 2%; group C - 16 rats IP injected with articaine 4%; group D - 16 rats IP injected with prilocaine 3% (6.0 mg.kg⁻¹); group E - 8 rats subcutaneously injected with a single dose of cyclophosphamide; and group F - 8 rats IP injected with saline. Eight rats from groups A to D received a single dose of anaesthetic on day 1 of the experiment; the remaining rats were injected once a day for 5 days.

Results: The median number of micronuclei in the local anesthetics groups exposed for one or 5 days ranged from 0.00 to 1.00, in the cyclophosphamide-exposed group was 10.00, and the negative control group for 1 and 5 days was 1.00 and 0.00, respectively ($p < 0.0001$). A significant difference in the number of micronuclei was observed between the cyclophosphamide group and all local anesthetic groups ($p = 0.0001$), but not between the negative control group and the local anesthetic groups ($p > 0.05$).

Conclusion: No genotoxicity effect was observed upon repetitive exposure to any of the local anesthetics evaluated.

© 2013 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Published by Elsevier Editora Ltda.

Este es un artículo Open Access bajo la licencia [CC BY-NC-ND](#)

Introducción

El desarrollo de agentes anestésicos locales seguros y eficaces fue uno de los más importantes avances de la ciencia odontológica a lo largo del siglo pasado. Los agentes odontológicos disponibles hoy por hoy son extremadamente seguros y respetan la mayoría de los criterios de un anestésico local ideal. Esos agentes anestésicos locales inducen una mínima irritación del tejido y presentan un bajo riesgo de originar reacciones alérgicas¹.

Un anestésico local se usa más a menudo en la odontología para controlar el dolor, además de ser muy utilizado en otros campos de la medicina. Entre las varias formulaciones de anestésicos locales, los tipos más utilizados son las sales anestésicas de lidocaína, mepivacaína y prilocaína².

La combinación de vasoconstrictor y de anestésico local fue usada por primera vez en 1901 cuando Braun administró simultáneamente adrenalina y cocaína³. Debido a las propiedades vasodilatadoras de la mayoría de las sales anestésicas, la duración de la anestesia no siempre es la adecuada, lo que muestra la necesidad de administración concomitante de un vasoconstrictor. Algunas ventajas de la administración combinada de vasoconstrictores y anestésicos son la lenta absorción de la sal anestésica (lo que reduce la toxicidad y aumenta la duración de la anestesia), la reducción de la cantidad de anestésico necesaria para anestesiarse al

paciente y el aumento de la eficacia del anestésico². Los vasoconstrictores más a menudo usados en combinación con los anestésicos locales pertenecen al grupo de las aminas simpaticomiméticas que incluye la adrenalina, la noradrenalina, la levonordefrina, fenilefrina y felipresina².

Los agentes genotóxicos afectan negativamente la integridad del material genético de una célula y son definidos como cualquier sustancia o producto químico que perjudique el ADN. Aunque la capacidad de una sustancia para dañar el ADN no la convierta automáticamente en un peligro para la salud, lo que nos preocupa es saber si la sustancia puede ser potencialmente mutagénica y/o carcinógena⁴.

Algunos anestésicos locales no han sido testados para la carcinogenicidad o genotoxicidad. La prilocaína es un anestésico local que fue analizado por el Programa Nacional de Toxicología (NTP, EE. UU.) desde octubre de 2007⁵.

El test de micronúcleos es muy usado para evaluar la capacidad de una sustancia para romper los cromosomas (su clastogenicidad) o para afectar la formación de la placa metafásica y/o huso mitótico, ambos capaces de conducir a la distribución desigual de cromosomas durante la división celular⁶. El test de micronúcleos genera resultados con un importante apoyo estadístico; por tanto, es ampliamente usado como una herramienta de selección para determinar la seguridad de muchas sustancias y clasificar a los agentes como cancerígenos o no cancerígenos⁷. La facilidad de

la realización del test de micronúcleos posibilitó su adopción generalizada en todo el mundo como un test estándar de genotoxicidad para monitorizar la seguridad de agentes para el uso en la población humana⁸.

De acuerdo con nuestra investigación, no existen estudios en la literatura sobre el potencial genotóxico del uso repetitivo de anestésicos locales. Los anestésicos locales son ampliamente usados en odontología y en medicina, y los estudios que calculan el riesgo de la exposición repetitiva a esas sustancias pueden contribuir con una mejor comprensión de sus efectos potencialmente tóxicos sobre el material genético y sus potenciales riesgos para los pacientes expuestos.

El objetivo de este estudio fue investigar el potencial genotóxico del uso repetitivo de anestésicos locales, usando el test de micronúcleos.

Métodos

Este estudio fue aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (Protocolo n.º. 930/11).

Para este estudio, 80 ratones Wistar machos de 12 semanas de edad, con un peso de entre 200 y 250 g, recibieron anestésicos locales. Los ratones fueron divididos en grupos de 6 y colocados en grandes cajas rectangulares (que medían 49 × 34 × 16 cm), apropiadas para acomodar hasta 5 ratones adultos. Los ratones fueron colocados en un criadero con una temperatura y una humedad controladas, equipado con un ciclo de luz de 12 h para luz/oscuridad. Antes de la administración del anestésico, todos los animales fueron pesados para calcular la dosificación adecuada.

Los animales fueron divididos en 6 grupos: grupo A: 16 ratones que recibieron inyecciones por vía intraperitoneal (IP) de clorhidrato de lidocaína y fenilefrina (Novocol® 100, SS White, Rio de Janeiro, Brasil) en una dosis de 4,4 mg/kg; grupo B: 16 ratones recibieron inyecciones IP de mepivacaína al 2% (mepivacaína, DFL, Jacarepaguá, Brasil) en una dosis de 4,4 mg/kg; grupo C: 16 ratones recibieron inyecciones IP de epinefrina y articaína al 4% (Septanest® 1:100.000, Septodont, Bruselas, Bélgica) en una dosis del 7 mg/kg; grupo D: 16 ratones recibieron inyección IP de prilocaína al 3% y felipresina (Cytanest®, Astra, São Paulo, Brasil) en una dosis de 6 mg/kg; grupo E: 8 ratones recibieron inyecciones por vía subcutánea en una dosis única de ciclofosfamida (Genuxal®, Baxter Oncology GmbH, Halle/Westfalen, Alemania) (50 mg/kg) en el primer día del experimento (grupo control positivo)⁸; grupo F: 8 ratones recibieron inyecciones IP de 0,5 mL de suero fisiológico (grupo de control negativo). Como en un informe anterior quedó demostrada la formación de micronúcleos en respuesta a una dosis de 50 mg/kg de ciclofosfamida, esta dosis fue usada para el grupo control positivo⁸.

Ocho ratones de los grupos A a D recibieron una dosis de anestésico el primer día del experimento. A los otros animales de esos grupos se les administró una dosis diaria de anestésico durante 5 días. Los ratones del grupo F recibieron suero fisiológico de modo similar.

Ocho ratones de los grupos A a D, 4 ratones del grupo F y todos los ratones del grupo E fueron sometidos a eutanasia 24 h después de la administración del anestésico. Los animales restantes de los grupos A, B, C, D y F fueron sacrificados

5 días más tarde. La eutanasia fue realizada con pentobarbital sódico (Syntec, Cotia, São Paulo, Brasil) en una dosis de 100 mg/kg por vía IP.

Las muestras de la médula ósea fueron recolectadas a partir del fémur de cada ratón en el momento del sacrificio, y fueron preparadas 2 láminas por animal⁸. Las láminas fueron coloreadas con Giemsa (Dolles, São Paulo, Brasil). Dos mil eritrocitos policromáticos (1.000 por lámina) fueron contados para cada animal con una ampliación de 400× usando un microscopio óptico para determinar el número de micronúcleos⁸. Los micronúcleos fueron definidos como estructuras con posibles aureolas alrededor de la membrana nuclear y con un volumen inferior a un tercio del volumen del diámetro del núcleo asociado; la intensidad de la coloración de los micronúcleos fue similar a la intensidad del núcleo asociado y ambas estructuras fueron observadas en el mismo plano focal⁹. El análisis de las láminas fue realizado de forma enmascarada por una sola persona (MCO) y revisada por una segunda persona (GAN). Ambos resultados fueron concordantes.

Análisis estadístico

La variación en la frecuencia de los micronúcleos no tuvo una distribución normal cuando fue analizada por el test de Kolmogorov-Smirnov ($p=0,0001$) y las variancias no fueron homogéneas ($p=0,004$) por el análisis del test de Levene. Por tanto, optamos por usar el test de Kruskal-Wallis, seguido de comparaciones múltiples con el test de Student-Newman-Keuls para determinar la significación estadística. Todos los test estadísticos fueron realizados adoptándose el nivel de significación de un 5%.

Resultados

Las medianas de los números de micronúcleos observadas para cada grupo fueron las siguientes: 1 y 0,50 para el grupo lidocaína en el primero y quinto días de exposición, respectivamente; 1 para el grupo mepivacaína tanto en el primero como en el quinto día de exposición; 1 y 0 para el grupo articaína en el primero y quinto días de exposición, respectivamente; 0 para el grupo prilocaína tanto en el primero como en el quinto día de exposición. En el grupo expuesto a la ciclofosfamida (control positivo), la mediana del número de micronúcleos fue 10. Las medianas de los grupos de control negativo para los días 1 y 5 fueron 1 y 0, respectivamente ($p<0,0001$) (figs. 1 y 2 y tabla 1).

El número de micronúcleos en el grupo control positivo (ciclofosfamida) fue diferente significativamente de los observados para todos los anestésicos locales estudiados, tanto en el tipo de anestésico administrado como en el tiempo de exposición ($p=0,0001$). Sin embargo, no se observó ninguna diferencia significativa en el número de micronúcleos entre el grupo control negativo y los grupos con anestésicos locales, independientemente del tipo de anestésico administrado o del tiempo de exposición ($p>0,05$) (tabla 1).

Con excepción del grupo ciclofosfamida, todos los grupos fueron iguales en los varios análisis estadísticos. Sin embargo, fueron observadas diferencias significativas en las frecuencias de micronúcleos entre el grupo prilocaína en el

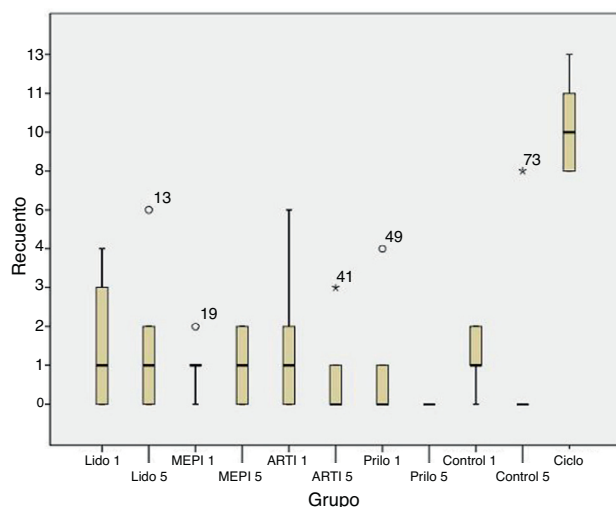


Figura 1 Recuentos de micronúcleos por grupo de estudio (mediana e intervalo intercuartílico). ARTI: articaína; Ciclo: ciclofosfamida (control positivo); Control: control negativo; Lido: lidocaína; MEPI: mepivacaína; Prilo: prilocaína; 1: exposición durante un día; 5: exposición durante 5 días. ○, outlier; *, El outlier del outlier; la numeración sobre el outlier corresponde a la numeración de los animales.

quinto día de exposición y los siguientes grupos: lidocaína en el primer día de exposición ($p=0,0466$), mepivacaína en el primero ($p=0,0437$) y quinto ($p=0,0460$) días de exposición, y articaína en el primer día de exposición ($p=0,0364$) (tabla 1).

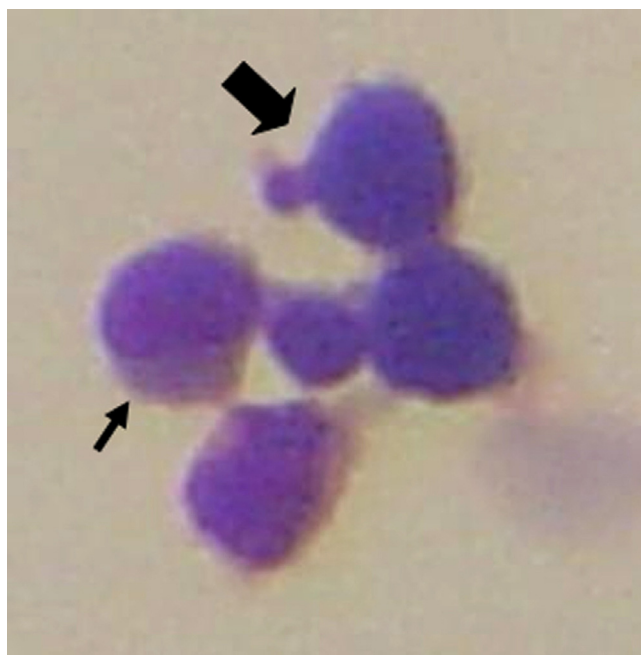


Figura 2 Ejemplos de eritrocito policromático con micronúcleos (flecha grande) y eritrocito policromático normal (flecha pequeña); el animal estuvo expuesto a la mepivacaína durante 5 días (coloración de Giemsa, 1000×).

Tabla 1 Mediana e intervalo intercuartílico de la frecuencia de micronúcleos para cada grupo ($n=80$)

Grupo	Mediana	Intervalo intercuartílico
Lidocaína – 1 día	1a	3
Lidocaína – 5 días	0,50a,c	2
Mepivacaína – 1 día	1a	1
Mepivacaína – 5 días	1a	2
Articaína – 1 día	1a	2
Articaína – 5 días	0a,c	1
Prilocaína – 1 día	0a,c	1
Prilocaína – 5 días	0c	1
Control negativo – 1 día	1a,c	2
Control negativo – 5 días	0a,c	4
Ciclofosfamida ^a	10d	3

^a Control positivo. Los resultados con letras diferentes son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

Discusión

Los test de genotoxicidad son importantes para calcular la toxicidad celular e identificar potenciales agentes cancerígenos y mutagénicos. Para testar la actividad genotóxica de un agente se usan varias técnicas, incluyendo ensayos que determinan el coeficiente de vínculo cruzado del ADN/proteína, actividad enzimática mitocondrial, proliferación celular, reparación de roturas de ADN, índice mitótico, tipo de daño sufrido, aberraciones cromosómicas, no disyunción cromosómica y niveles de apoptosis y necrosis⁸. El test de micronúcleos ha sido ampliamente utilizado para testar la genotoxicidad de muchos productos químicos. Los micronúcleos son fácilmente visualizados en muestras de eritrocitos y son un importante indicativo de aberraciones cromosómicas⁶.

El test de micronúcleos fue relatado por primera vez en 1970 por Boller y Schmid y posteriormente fue usado por Heddle en 1977¹⁰. El micronúcleo es un núcleo adicional, separado del núcleo principal de una célula durante la división celular y está compuesto por cromosomas enteros o por fragmentos cromosómicos que sobran de otros cromosomas después de la conclusión de la mitosis. Los micronúcleos son el resultado de los cambios estructurales espontáneos o experimentalmente inducidos en el cromosoma, o a través de errores de fusión celular, quedando por tanto excluidos de los nuevos núcleos que son reformados en la telofase¹¹.

Las ventajas del ensayo de micronúcleos con relación a otros test usados para diagnosticar enfermedades y monitorizar contaminantes ambientales incluyen el análisis simplista, la alta sensibilidad de detección y la exactitud de las pérdidas cromosómicas y eventos de no disyunción, capacidad de medir la extensión y la progresión de la división nuclear y la capacidad de detectar eventos de reparación y resección⁸. Esas ventajas nos llevaron a elegir el test de micronúcleos para evaluar los efectos genotóxicos de la administración repetitiva de anestésicos locales en este estudio.

Una desventaja en el uso de vasoconstrictores en combinación con los anestésicos locales queda expuesta claramente con las inyecciones intravasculares, durante las

cuales las concentraciones elevadas y los grandes volúmenes pueden conducir a la intoxicación¹². Por tanto, el uso de vasoconstrictores no está indicado en algunos pacientes, especialmente en personas con diabetes o con enfermedad cardíaca o mujeres embarazadas. En esos casos, la sal anestésica más a menudo usada en la falta de un vasoconstrictor es la mepivacaína¹². En este estudio usamos mepivacaína sin un vasoconstrictor. No hay relatos en la literatura que calculen la acción genotóxica de los vasoconstrictores.

La prilocaína fue anteriormente relatada por tener una actividad genotóxica en las células somáticas y por inducir a una recombinación homóloga. Sin embargo, se informó que la lidocaína y la articaína (Septanest®) no indujeron una mutación cromosómica o recombinación¹³. No hubo asociación entre la genotoxicidad y ninguna de los fármacos analizados en este estudio. Esos resultados están parcialmente de acuerdo con la literatura, siendo diferentes solo respecto al informe anterior de genotoxicidad para la prilocaína¹³.

Quedó demostrado que el porcentaje de células con poliploidia y endorreduplicación aumenta después de la exposición al clorhidrato de procaína y el clorhidrato de prilocaína, tanto en presencia como en ausencia de la activación metabólica exógena¹⁴. Esos resultados indican que tales agentes químicos son potencialmente genotóxicos para las células de mamífero¹⁴. Sin embargo, este estudio no mostró ninguna acción genotóxica de prilocaína, tal vez porque fue usada en la dosis recomendada por kilogramo de peso.

La condensación y fragmentación nuclear de la cromatina fueron previamente observadas en las células tratadas con prilocaína¹⁵. La fragmentación del ADN también fue inducida por tratamiento con prilocaína de forma dosis-dependiente y tiempo-dependiente, con efectos máximos observados en concentración de 5 mM después de 12-48 h de exposición¹⁵. Conjuntamente con ese estudio, esos datos nos indican que el uso de la prilocaína en la dosis recomendada, por kilogramo de peso corporal, no puede causar ningún daño genético.

La lidocaína y la prilocaína son metabolizadas principalmente en el hígado y por ende hidrolizadas por ésteres de amida, liberando las aminas aromáticas monocíclicas, 2,6-dimetilanilina (DMA) y 2-metilalanina (MA) respectivamente⁵. Otros anestésicos que contienen una fracción de DMA incluyen bupivacaína, mepivacaína y ropivacaína⁵.

El principal mecanismo carcinogénico de las aminas aromáticas, como DMA y MA, se da cuando el citocromo P450 metaboliza esos compuestos en derivados de N-hidroxila⁵. DMA y MA pueden ser posteriormente metabolizadas por su conjugación con los metabolitos reactivos. La lesión del ADN fue descrita para DMA, pero no para MA. Se cree que la formación de aductos de ADN sea tal vez el mecanismo por el cual esos compuestos ejercen algunos de sus efectos carcinogénicos¹⁶.

Sin embargo, la Agencia Internacional para Investigación en Cáncer (IARC) no ha relatado efectos cancerígenos de DMA en humanos, aunque no existan pruebas suficientes de su carcinogenicidad en ratones⁵. Eso puede explicar el mayor número de micronúcleos observados en el grupo lidocaína (independientemente del tiempo de exposición), en comparación con el grupo prilocaína, y la diferencia significativa entre los grupos expuestos a la lidocaína durante un

día y a la prilocaína durante cinco días ($p=0,0466$). Aunque la frecuencia de micronúcleos en el grupo expuesto a la lidocaína no haya sido significativamente diferente de la del grupo control negativo, la mayor frecuencia de micronúcleos en el grupo expuesto a la lidocaína (en comparación con el grupo prilocaína) puede estar asociada con los efectos de la DMA, un producto metabólico de la lidocaína.

En la literatura no hay informes sobre el potencial genotóxico o mutagénico de la mepivacaína. En este estudio, la mepivacaína no mostró genotoxicidad, independientemente del tiempo de exposición. Sin embargo, el grupo expuesto a la mepivacaína durante uno y 5 días fue significativamente diferente del grupo expuesto a la prilocaína durante 5 días ($p<0,05$). La mepivacaína también contiene una fracción de DMA⁵, lo que puede explicar el mayor número de micronúcleos observado en ese grupo, aunque la frecuencia de micronúcleos no haya sido significativamente diferente en el grupo control negativo.

Los estudios de mutagenicidad *in vitro* e *in vivo* no revelaron ningún potencial genotóxico de la articaína (CAS 23964-58-1), hasta alcanzar la dosis máxima tolerada. De acuerdo con los datos de este estudio, otra preparación de articaína (Septanest® SP; 4% articaína. HCl y epinefrina 1:100.000)¹⁷ no presentaron efectos genotóxicos en un estudio *in vivo* usando la dosis recomendada por kilogramo de peso. Aunque la articaína pertenezca al grupo amida de anestésicos locales (que también incluye la lidocaína, la prilocaína y la mepivacaína), es metabolizada por la colinesterasa en el plasma en ácido articaínico vía hidrólisis. El ácido articaínico es un metabolito inactivo, parcialmente metabolizado en el riñón en glucurónido de ácido articaínico, en vez de una amina aromática potencialmente genotóxica¹⁸. Ese resultado puede explicar parcialmente la ausencia de genotoxicidad después de la exposición a la articaína. Sin embargo, el grupo expuesto a la articaína durante un día fue significativamente diferente del grupo expuesto a la prilocaína durante 5 días ($p=0,0364$). Eso puede deberse a la presencia de un *outlier* en el grupo articaína, que estaba bastante por encima de la frecuencia promedio global de micronúcleos.

Conclusiones

En el presente estudio no hubo aumento de la frecuencia de micronúcleos después de la exposición a cualquiera de los anestésicos locales testados (lidocaína, mepivacaína, articaína y prilocaína) cuando se usaron en la dosis recomendada por kilogramo de peso corporal, con una única exposición o con la administración repetitiva. Sin embargo, se deben realizar otros ensayos que evalúan la genotoxicidad y la mutagenicidad para determinar definitivamente que el uso repetitivo de esos anestésicos no presenta ninguna actividad mutagénica o genotóxica.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Moore PA, Hersh EV. Local anesthetics: pharmacology and toxicity. *Dent Clin North Am.* 2010;54:587-99.

2. Mariano RC, Santana SI, Coura GS. Análise comparativa do efeito anestésico da lidocaína 2% e da prilocaína 3%. *BCI Rev Bras Cir Implantodont*. 2000;7:15–9.
3. Jastak JT, Yagiela JA. Vasoconstrictors and local anesthesia: a review and rationale for use. *J Am Dent Assoc*. 1983;107:623–30.
4. Smith MT. The mechanism of benzene-induced leukemia: a hypothesis and speculations on the causes of leukemia. *Environ Health Perspect*. 1996;104:1219–25.
5. Duan JD, Jeffrey AM, Williams GM. Assessment of the medicines lidocaine, prilocaine, and their metabolites, 2,6-dimethylaniline and 2-methylaniline, for DNA adduct formation in rat tissues. *Drug Metab Dispos J*. 2008;8:1470–5.
6. Flores M, Yamaguchi UM. Micronucleus test: an evaluation for genotoxic screening. *J Health Res*. 2008;1:337–40.
7. Fenech M, Holland N, Chang WP, et al. The HUMAN MicroNucleus Project – an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res*. 1999;428:271–83.
8. MacGregor JT, Heddle JA, Hite M, et al. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutat Res*. 1987;189:103–12.
9. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res*. 1992;271:69–77.
10. Evans HJ. Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view. *Mutat Res*. 1997;392:5–10.
11. Ramírez A, Saldanha PH. Análise crítica de grupos controle no teste de micronúcleo na mucosa bucal. *Genet Mol Biol*. 1998;21:140.
12. Perusse R, Goulet JP, Turcotte JY. Contraindications to vasoconstrictors in dentistry: part I. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1992;74:679–86.
13. Schneider LE, do Amaral VS, Dohl RR, et al. Assessment of genotoxicity of lidocaine, prilonest and septanest in the drosophila Wing-Spot test. *Food Chem Toxicol*. 2009;47:205–8.
14. Hagiwara M, Watanabe E, Barrett JC, et al. Assessment of genotoxicity of 14 chemical agents used in dental practice: ability to induce chromosome aberrations in Syrian hamster embryo cells. *Mutat Res*. 2006;603:111–20.
15. Nakamura K, Kido H, Morimoto Y, et al. Prilocaine induces apoptosis in osteoblastic cells. *Can J Anaesth*. 1999;46:476–82.
16. Preston RJ, Williams GM. DNA-reactive carcinogens: mode of action and human cancer hazard. *Crit Rev Toxicol*. 2005;35:673–83.
17. Leuschner J, Leblanc D. Studies on the toxicological profile of the local anaesthetic articaine. *Arzneimittelforschung*. 1999;49:126–32.
18. Snoeck M. Articaine: a review of its use for local and regional anesthesia. *Local Reg Anesth*. 2012;5:23–33.